



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 196 18 032 A 1

61 Int. Cl.®:
G 01 N 1/28
G 01 N 27/62
G 01 N 33/53
H 01 J 49/10

21 Aktenzeichen: 196 18 032.5
22 Anmeldetag: 4. 5. 96
43 Offenlegungstag: 13. 11. 97

DE 196 18 032 A 1

71 Anmelder:
Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

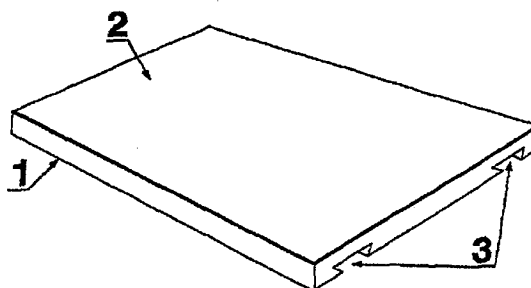
72 Erfinder:
Köster, Claus, 28865 Lillenthal, DE; Franzen, Jochen,
28359 Bremen, DE; Suckau, Detlev, 28879 Grasberg,
DE

56 Entgegenhaltungen:
DE 41 43 071 C2
GB 22 35 529 A
GB 22 35 528 A
EP 00 34 318 A2

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Lagerfähig vorpräparierte Maldy-Probenräger

57 Die Erfindung betrifft vorpräparierte Probenräger für die matrixunterstützte ionisierende Laserdesorption großer Analytmoleküle (MALDI) zur Erzeugung von Ionen der Analytsubstanz für deren massenspektrometrische Untersuchung, und Verfahren für die Präparation der Probenräger. Die Erfindung besteht darin, die mit einer Matrixsubstanz für die Unterstützung der Desorption fertig präparierten Probenräger dadurch versand- und lagerfähig zu machen, daß die Matrixsubstanz aus mindestens zwei verschiedenen Komponenten gebildet wird, wobei eine lackartige Komponente weitere Substanzen, die während der Laserdesorption für die Ionisierung der Analytmoleküle sorgen, vor Oxidation, Hydrolyse und anderen Arten der Zersetzung schützt. Die lackartige Komponente adsorbiert auch die Analytmoleküle an der Oberfläche und unterstützt die Desorption bei Laserbeschuß. Besonders geeignet ist eine dünne Schicht aus Nitrozellulose (korrekter: Zellulosenitrat), in der die zur Ionisierung der Analytmoleküle notwendigen Substanzen eingebettet werden. Die in Wasser unlösliche Lackschicht adsorbiert die großen Analytmoleküle aus Lösung an ihrer Oberfläche. Die vorpräparierte Schicht kann auch weitere Komponenten zur gewollten Veränderung der Analytmoleküle enthalten, beispielsweise Enzyme zur gezielten Verdauung von Proteinen. Auch Komponenten für das selektive Binden von Analytmolekülen können vorhanden sein, etwa Antikörper zum Festhalten spezifischer Proteine.



DE 196 18 032 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 09. 97 702 046/183

8/25

Die Erfindung betrifft vorpräparierte Proben-träger für die matrixunterstützte ionisierende Laserdesorption großer Analytmoleküle (MALDI) zur Erzeugung von Ionen der Analytsubstanz für deren massenspektrometrische Untersuchung, und Verfahren für die Präparation der Proben-träger.

Das Verfahren der massenspektrometrischen Untersuchungen von großmolekularen Analytsubstanzen mit Ionisierung durch laserinduzierte Desorption besteht darin, den Proben-träger mit oberflächlich aufgetragener Analytsubstanz einem Lichtpuls aus einem Laser auszusetzen, der auf die Probenoberfläche fokussiert wird. Dieser Lichtpuls erzeugt Ionen der Analytmoleküle, die dann mit ionenoptischen Mitteln der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden. Es finden dabei insbesondere Flugzeitmassenspektrometer, aber auch ionenspeichernde Massenspektrometer, wie Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallen (häufig einfach "Ionenfallen" genannt) oder Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer ("ICR-Spektrometer"), Anwendung.

Für den besonderen Fall der Flugzeitmassenspektrometrie wird der Proben-träger konstant auf eine Hochspannung zwischen 6 und 30 Kilovolt gelegt, dem in einer Entfernung von 10 bis 20 Millimetern eine Grundlektrode auf Erdpotential gegenüberliegt. Ein Laserpuls von typischerweise etwa 4 Nanosekunden Dauer übernimmt die Ionisierung. Die Ionen werden durch das elektrische Feld zur Grundlektrode hin beschleunigt und erhalten dabei alle die gleiche kinetische Energie. Jenseits der Grundlektrode befindet sich die feldfreie Flugstrecke des Flugzeitmassenspektrometers. Am Ende der Flugstrecke werden die ankommenden Ionen detektiert, aus ihrer Flugzeit läßt sich — bei gleicher kinetischer Energie — ihre Masse bestimmen. Bei Verwendung von ionenspeichernden Massenspektrometern wie Quadrupol-Ionenfallen oder ICR-Spektrometern werden die desorptiv erzeugten Ionen mit ionenoptischen Mitteln in die Speicherzellen der Massenspektrometer überführt und dort massenspektrometrisch untersucht.

Für die Ionisierung von großen Analytmolekülen durch die weithin bekannte matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI = matrix assisted laser desorption and ionization), die in den vergangenen Jahren eine große Verbreitung gefunden hat, werden die großen Moleküle der Analytsubstanz auf dem Proben-träger in eine Schicht winziger Kristalle einer niedermolekularen Matrixsubstanz eingelagert. Der Laserlichtpuls verdampft praktisch momentan eine geringe Menge der Matrixsubstanz. Die Dampf Wolke nimmt zunächst praktisch den gleichen Raum ein wie die Festsubstanz, steht also unter hohem Druck. Auch die großen Analytmoleküle werden in die zunächst winzige Dampf Wolke überführt. Bei der Bildung der Dampf Wolke wird ein geringer Teil der Moleküle, und zwar sowohl der Matrix- wie auch der großen Analytmoleküle, ionisiert. Anschließend dehnt sich die Dampf Wolke in einem adiabatischen und isentropischen Prozeß ähnlich einer Explosion in das umgebende Vakuum aus. Solange während der Ausdehnung der Dampf Wolke noch Kontakt der Moleküle untereinander besteht, findet durch Ionen-Molekül-Reaktionen eine fortgesetzte Ionisierung der großen Analytmoleküle auf Kosten der kleineren Matrixionen statt.

Die ins Vakuum expandierende Dampf Wolke beschleunigt durch ihre adiabatische Ausdehnung nicht nur die Moleküle und Ionen der Matrixsubstanz, son-

dern durch viskose Mitnahme auch die Moleküle und Ionen der Analytsubstanz. Die dabei auftretende Streuung der Anfangsgeschwindigkeiten bei laserinduzierter Ionisierung beeinträchtigt und begrenzt die Massenauf-lösung der Flugzeitmassenspektrometer. Es gibt jedoch eine Methode, die Ionen wieder zeitlich zu fokussieren und damit das Auflösungsvermögen zu verbessern.

Für die anderen genannten Arten der Massenspektrometrie ist die Streuung der Anfangsenergien ebenfalls schädlich, da sie den Einfangsprozeß der Ionen in den Speicherzellen erschwert. Hier ist noch keine Methode zur Verbesserung des Einfangs bekannt.

Die Matrixsubstanz muß gegenwärtig verschiedenartige Aufgaben gleichzeitig erfüllen, wobei stets nur ein gewisser Kompromiß erreicht werden kann: Sie muß die Analytmoleküle in ihre Kristalle aufnehmen und über das Aufwachsen der Kristalle auf dem Proben-träger festhalten. Sie muß das Licht der Laserstrahlung effektiv absorbieren und so in kürzester Zeit genügend Energie für die momentane Verdampfung aufnehmen. Während der Verdampfung muß sie eine solch hohe Plasmatemperatur erreichen, daß ein nicht zu kleiner Bruchteil der Moleküle ionisiert vorliegt, andererseits darf die Matrixsubstanz nicht — etwa durch Zersetzung — ihre zur Ionisierung befähigenden Eigenschaften verlieren. Sie muß dann im anschließenden Ionisierungsprozeß die großen Analytmoleküle durch Protonierung ionisieren.

Dieses Aufgabenspektrum ist sehr schwierig zu erfüllen; die Matrixsubstanzen sind daher recht komplexer Natur.

Bisherige Präparationsmethoden verlangen eine frische Präparation, wobei Analyt und Matrix zu gleicher Zeit in einer Lösung auf den Proben-träger gebracht und getrocknet werden. Dieses Verfahren verfolgt das Ziel, die Analytmoleküle in die Mikrokristalle der Matrixsubstanz einzuschließen, die sich beim Trocknen des aufgetragenen Tröpfchens bilden. Es sind nur einige wenige Verfahren bekannt geworden, erst die Matrixsubstanz und später die Analytsubstanz auf den Proben-träger aufzubringen, und diese Verfahren verlangen zu-mehr ein zumindest teilweises Anlösen der vorher aufgetragenen Matrixkristalle (siehe beispielsweise GB 2 236 185).

Selbst bei einer Vorpräparation der Matrixschicht und späterem Aufbringen der Analytsubstanz muß die Matrixschicht relativ frisch aufgebracht werden. Der Grund dafür ist, daß die bisher bekannt gewordenen Matrixsubstanzen ganz überwiegend empfindlich gegenüber Oxidation, Hydrolyse und anderen verändernden Prozessen durch Luftbestandteile sind und sich daher leicht zersetzen. Sie sind — besonders in der feinen Verteilung auf der Oberfläche einer Trägerplatte — spätestens nach einigen Tagen für den vorliegenden Zweck der Ionisation unbrauchbar. Selbst die längere Lagerung der Matrixsubstanzen in angebrochenen Flaschen ist kritisch und nicht zu empfehlen.

Diese Verfahren sind also nicht geeignet, große Anzahlen von MALDI-Trägerplatten vorzupräparieren und dann zu verbrauchen. Insbesondere sind sie nicht für eine industrielle Vorpräparation verkaufter Proben-träger geeignet.

Darüberhinaus sind Verfahren bekannt geworden, die Analytmoleküle beim Aufbringen auf den Proben-träger in situ zu verändern, um die Aussagefähigkeit der massenspektrometrischen Untersuchungsmethode zu vergrößern. Beispielsweise können Proteine durch einen tryptischen oder andersartigen enzymatischen Verdau

in charakteristischer Weise so in Bruchstücke zerlegt werden, daß über eine Messung der Molekulargewichte dieser Bruchstücke eine sofortige Identifizierung des aufgetragenen Proteins anhand von Protein-Datenbanken möglich wird. Krankhafte Veränderungen eines bekannten Proteins können ebenfalls durch einen solchen Verdau mit anschließender Messung der Molekulargewichte der Bruchstücke festgestellt werden, wobei es sogar möglich ist, das veränderte Teilstück der Proteinkette zu erkennen.

Die dazu notwendigen Enzyme sind relativ stabil. Sie könnten einer vorpräparierten Matrixschicht beigegeben werden, wenn diese haltbar vorpräpariert werden könnte, und wenn die Enzyme nicht in direkter Berührung zu den meist sauren Ionisierern der Matrix aufgebracht werden könnten. Da es jedoch keine lagerfähige Matrixpräparation gibt, verlangt auch diese Methode jeweils frischen Ansatz. Sie ist damit sehr aufwendig.

Es ist die vordringliche Aufgabe der Erfindung, das Verfahren zur Präparation von MALDI-Schichten und das MALDI-Verfahren der Ionisierung von Analytmolekülen selbst so abzuwandeln, daß eine Vorpräparation der Probenträger erfolgen kann, und zwar so, daß die Probenträger über längere Zeit ohne Funktionsverlust gelagert werden können. Die vorpräparierten Probenträger sollen es ermöglichen, die Analytmoleküle in einfacher Weise aufzubringen, beispielsweise in der Form automatisch aufpipettierter Tröpfchen. Die Analysesubstanzen sollen von der vorpräparierten Schicht so festgehalten werden, daß sie waschbar werden, um Reste an Puffersubstanzen oder Salzen zu entfernen. Es ist also das Ziel, die verwendeten Matrixkomponenten für die Ionisierung der Analysesubstanzen vor Zersetzung während des Transportes oder der Lagerung zu schützen, und das Aufbringen der Analytmoleküle zu erleichtern. Es soll insbesondere möglich sein, vorpräparierte Probenträger industriell herstellbar und vertreibbar zu machen.

Eine weitergehende Aufgabe der Erfindung soll es sein, auch Vorpräparationen unter Einschluß anderer Reaktionspartner zu ermöglichen, beispielsweise mit Enzymen zum charakteristischen Verdau von Proteinen, aber auch mit anderen Chemikalien zur gezielten Veränderung der Analysesubstanzen.

Die Erfindung soll ein MALDI-Verfahren mit hoher Ionenausbeute und hoher Empfindlichkeit liefern, um mit eingesetzten Probenmengen von nur wenigen Femtomol arbeiten zu können. Sie soll darüberhinaus durch eine gleichmäßige Schicht automatisch ablaufende MALDI-Prozesse ermöglichen.

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, das Aufgabenspektrum, das die Matrixsubstanz zu erfüllen hat, auf zwei oder mehr Substanzkomponenten aufzuteilen, und dabei einer Substanzkomponente die zusätzliche Aufgabe des Schutzes der anderen Substanzkomponenten zuzuweisen. Dabei liegt der Erfindung die experimentell gewonnene Erkenntnis zugrunde, daß für einen erfolgreichen MALDI-Prozess die Analytmoleküle und die Moleküle der ionisierenden Substanzkomponente nicht schon im festen Zustand in Berührung sein müssen. Diese Berührung im festen Zustand, im idealen Fall der Einbau der Analytmoleküle in die Mikrokristalle der Matrixsubstanz, war bisher das Ziel aller Präparationsverfahren.

Eine Aufteilung des Aufgabenkatalogs auf zwei Substanzen kann nach diesem Grundgedanken der Erfindung etwa so aussehen:

(a) eine erste Matrixsubstanz (ein "Binder") übernimmt die adsorptive Bindung der Analytmoleküle an einer vorzugsweise glatten Oberfläche, sie übernimmt die Bindung an die Unterlage, sie kann vorzugsweise die Energieabsorption übernehmen, sie übernimmt insbesondere die Bildung der Plasmawolke und sie übernimmt zusätzlich nach dem Grundgedanken dieser Erfindung den Schutz der ionisierenden Matrixkomponente;

(b) mindestens eine weitere Matrixsubstanz (ein "Ionisierer"), die vorzugsweise molekular in der ersten Substanz gelöst ist, übernimmt die Ionisierung der Analytmoleküle in der Plasmawolke; sie kann aushilfsweise auch die Energieabsorption übernehmen, wenn diese nicht von der ersten oder von weiteren Matrixsubstanzen übernommen wird.

Der Schutz der ionisierenden Matrixkomponente kann am besten verwirklicht werden, wenn der (oder die) Ionisierer ganz in einer luft- und wasserdichten Masse des Binders eingeschlossen werden kann. Es ist daher ein weitergehender Gedanke der Erfindung, einen lackartig verarbeitbaren Binder zu verwenden, der den Ionisierer in molekularer Lösung in die Lackmasse aufnehmen kann.

Es ist nun für den MALDI-Prozeß notwendig, daß der Binder die Moleküle des Ionisierers bei der Desorption freigibt. Das kann beispielsweise durch vollständige Verdampfung geschehen. Da aber lackartige Schichten in der Regel aus polymeren Molekülen aufgebaut sind, ist eine solche vollständige Verdampfung nicht ohne weiteres möglich. Es ist daher ein weiterer Erfindungsgedanke, daß der Binder die Freigabe der Moleküle des Ionisierers am besten erfüllen kann, wenn er sich bei Laserlichtbeschuß in kleine Moleküle zersetzt. Als besonders vorteilhaft bieten sich hier polymere Sprengstoffe an, die sich bei Erhitzung durch den Laserstrahl exotherm in die kleinen Moleküle Wasser, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Stickstoff und Wasserstoff zersetzen. Es muß aber nicht unbedingt ein solch starker exothermer Zersetzungsvorgang wie bei Sprengstoffen sein, auch schwach exotherme oder sogar leicht endotherme Zersetzungsvorgänge, deren Energiezufuhr aus dem Laserlicht stammt, können hier eingesetzt werden.

Der Binder muß aber auch die Aufgabe der adsorptiven Bindung der Analytmoleküle übernehmen können, da die umschlossenen Moleküle des Ionisierers diese Aufgabe nicht übernehmen können. Es ist nun ein weiterer Erfindungsgedanke, hier hochadsorptive Polymerstrukturen zu benutzen, wie sie etwa aus Adsorptionsäulen zur Reinigung von hochmolekularen organischen Stoffen oder von Blotmembranen zum Blotten 2D-elektrophoretischer Trennung bekannt sind.

Ein hervorragende Kombination einer hochadsorptiven, zur Lackherstellung geeigneten polymer strukturierten Substanz mit erwünschtem Sprengstoff-Charakter ist die Nitrozellulose (korrekter: Zellulosenitrat, Kurzzeichen nach DIN: CN), deren Explosivität sich darüber hinaus durch den Grad der Nitrierung einstellen läßt. Man spricht bei Stickstoffgehalten zwischen 10,5 und 12,5% von Zellulosedinitrat (Collodiumwolle), bei solchen zwischen 12,5 und 14,14% von Zellulosetrinitrat (Schießbaumwolle). Beide Sorten verpuffen bei Erhitzung, die Verpuffungsheftigkeit nimmt mit höherer Nitrierung zu. Zellulosenitrate bestehen aus etwa 100 bis 3500 teil- bis vollnitrierten Glukose-Einheiten.

Der Binder kann, muß aber nicht notwendig die Aufgabe der Lichtabsorption übernehmen. Diese Aufgabe

kann durch eine Derivatisierung des Zellulosenitrats gelöst werden, wobei absorptive Molekülgruppen in das Zellulosegerüst eingebaut werden. Durch Wahl der Molekülgruppen kann man sich an die Wellenlänge des verwendeten Lasers anpassen. — Es ist aber auch möglich, diese Aufgabe einer dritten Matrixsubstanz zu übertragen. Zellulosenitrat ist hervorragend färbbar, und kann somit für beliebige Wellenlängen undurchsichtig gemacht werden.

Das Zellulosenitrat kann sehr einfach in Azeton gelöst als Lackschicht auf den Probenträger aufgebracht werden, sowohl durch Sprühen, Streichen oder Drucken. Es wird eine gleichmäßige und glatte Schicht erzeugt, die wiederum auch eine Grundvoraussetzung sowohl für die Automatisierbarkeit der Probenvorbereitung und wie auch für die Automatisierbarkeit der MALDI-Ionisierung ist. Eine gleichmäßige Schichtdicke ist auch für die Genauigkeit der Massenbestimmung notwendig. Aus Zellulosenitrat werden technisch die sogenannten Nitrolacke hergestellt. Nitrolacke verwenden meist das weniger nitririerte Zellulosedinitrat als Grundstoff. Erst die Nitrirung der Zellulose ermöglicht die Lösung des entstehenden Produkts in organischen Lösemitteln.

Die Zellulosegrundstruktur ist besonders günstig für die oberflächliche Bindung der Analytmoleküle wegen ihrer besonders starken Adsorptivität. Da Nitrozellulose nicht in Wasser lösbar ist, kann man Proteine, wasserlösliche Polymere und andere großmolekulare Analytsubstanzen sehr einfach aus wässriger Lösung auf die Lackschicht aufbringen. Nitrozellulose wird häufig für Blotmembranen verwendet; sie hat gegenüber anderen, meist teureren Blotmembranen den Nachteil, daß die Analytmoleküle sehr fest, für viele Untersuchungsmethoden zu fest, an der Oberfläche haften. Dieser Nachteil ist im vorliegenden Fall ein Vorteil. Die wässrige Lösung von hochmolekularen Analytsubstanzen wie Proteinen enthält neben den Analytmolekülen häufig noch stabilisierende Puffersalze und andere für den Ionisierungsprozeß schädliche Bestandteile. Die feste Haftung der Analytmoleküle und die Wasserunlöslichkeit der Nitrozellulose ermöglicht ein leichtes und verlustarmes Waschen der aufgetragenen großmolekularen Analytsubstanz.

Sprengstoffe mit ihrer exothermen Zersetzung führen auch gleichzeitig zu einer sehr konstanten Wolkenbildung, dadurch ergeben sich für die Flugzeit-Massenspektrometrie günstige Voraussetzungen für eine hohe Massengenauigkeit. Kleinere Energieunterschiede im Laserlichtstrahl spielen eine untergeordnete Rolle. Der Sprengstoff wird dabei so dünn aufgetragen (teilweise nur Bruchteile eines Mikrometers), daß ein selbständiges Nachbrennen in Nachbarbereiche unterbleibt, da der Probenträger stark kühlt und die Verbrennung löscht im Gegensatz zu normalem MALDI, bei dem man Laserlichtfokussdurchmesser von 100 bis 200 Mikrometer bevorzugt, um großflächig eine dünne Schicht der Matrixoberfläche abzutragen, kann man bei Sprengstoff-MALDI mit Fokussdurchmessern von 5 bis 20 Mikrometern arbeiten. Es wird dabei innerhalb dieses Durchmessers die gesamte Schicht bis auf den Probenträger darunter abgetragen.

Das Aufbringen der Analytmoleküle auf die Oberfläche der Lackschicht hat den weiteren Vorteil, daß die so gebildeten Ionen der Analytmoleküle nach Ausdehnung der Wolke eine weit geringere Streuung ihrer Anfangsgeschwindigkeiten zeigen. Die Ionen lassen sich daher viel besser in Speicherzellen von ionenspeichernden

Massenspektrometern einfangen, und sie erhöhen die Genauigkeit der Massenbestimmung in Flugzeit-Massenspektrometern.

Um die aufgetragene Schicht auch gegen nicht-wäßrige Lösungsmittel unlöslich zu machen, ist es besonders vorteilhaft, die meist fadenförmigen Moleküle der Lackschicht nach Aufbringen auf den Probenträger zumindest an der Oberfläche zu vernetzen. Das kann durch Zugabe eines Brückenbildners geschehen, aber auch durch ionisierende Bestrahlung, zum Beispiel mit UV-Licht. Für die oberflächliche Vernetzung von Zellulosenitrat hat sich Diisocyanat als Brückenbildner bewährt, das restliche OH-Gruppen benachbarter Molekülstränge miteinander verbindet. Diese Vernetzung unterbindet die Lösbarkeit in organischen Lösemitteln. Die Vernetzung unterbindet nicht die Zersetzlichkeit des Zellulosenitrats unter Einwirkung der Laserstrahlung.

Es hat sich experimentell erwiesen, daß die Konzentration des Ionisierers nicht hoch zu sein braucht. Unsere Versuche haben sich allerdings auf Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (kurz "Alpha-Cyano") beschränkt. Mit etwa 10% Alpha-Cyano in 90% Nitrozellulose erhält man einen nahezu klaren Lack, der sich sehr dünn aufbringen läßt. Er bildet eine gute Grundlage für die Ionisierung von praktisch allen Arten von Proteinen, die leicht aus wäßriger Lösung auf die Oberfläche des wasserunlöslichen Lacks aufgebracht werden können.

Es ist jedoch zu erwarten, daß die Suche nach besseren Ionisierern bald Ergebnisse liefern wird, die die Ausbeute an Analytionen, die jetzt etwa bei 1/10000 Ionen pro Analytmolekül liegt, ganz wesentlich erhöhen werden.

Es können in der Lackschicht auch mehrere ionisierende Substanzen gleichzeitig untergebracht werden. Sie können sowohl als eine einzige Lösung mit mehreren Komponenten auf den Probenträger aufgebracht sein, aber auch als schichtartiger Aufbau mit mehreren Lacklösungen übereinander, die jeweils nur eine einzige ionisierende Komponente enthalten. Die Lackschichten — sowohl als Einzelkomponenten-Schicht, als Mehrkomponenten-Schicht wie auch als Mehrschichten-Aufbau — können durch eine schützende Deckschicht wasser- und luftdicht abgedeckt sein. Die Deckschicht enthält zweckmäßigerweise keinen Ionisierer. Die Vernetzung kann sich auf die Deckschicht oder sogar nur auf die Oberfläche der Deckschicht beschränken.

Für den MALDI-Prozeß ist es erforderlich, daß die Dampfvolke in einem Gebiet definierten elektrischen Potentials entsteht. Da die Lackschicht nichtleitend ist, hat es sich als günstig erwiesen, einen leitenden Probenträger zu verwenden. Im Falle einer Verwendung von nichtleitenden Probenträgern ist eine oberflächliche Metallisierung angebracht. Diese kann sehr dünn, sogar fast durchsichtig sein, um einen Laserbeschuß von der Rückseite her durch den Probenträger hindurch zu ermöglichen.

Um Aufladungen der Lackschicht zu vermeiden, oder um die Lackschicht selbst leitend zu machen, kann dem Lack auch ein Leiter in disperser Form zugesetzt werden. Dazu kann beispielsweise Kohlenstoff in feinsten, disperser Form verwendet werden.

Durch solcherart leitfähig gemachte Schichten ist es möglich, Probenträgerplatten herzustellen, die direkt als Blotmembran zum Blotten zweidimensional durch Gel-Elektrophorese getrennter Eiweiße benutzt werden können. Die 2-dimensionale Abtastung durch MALDI ergibt eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber üblichen Färbungsmethoden, die bei mehreren Zehner-

potenzen liegt und darüberhinaus zuverlässige Information über das Molekulargewicht bietet.

Wenn wir vom Blotten absehen, so werden die Analytmoleküle meist einfach durch Aufbringen eines winzigen Tröpfchens der Analytlösung auf die adsorptive Schicht aufgebracht. Die glatte Lackschicht erlaubt dabei ein automatisches Aufpipettieren kleiner Tröpfchen, in denen sich gelöste Analytmoleküle befinden. Die Tröpfchen behalten auf der Lackschicht eine etwa halbkugelige Form, aus der die Analytmoleküle in relativ kurzer Zeit durch Diffusion und feste Adsorption an der Lackoberfläche herausgezogen werden. Das Tröpfchen muß oft nicht einmal eintrocknen, nach Adsorption der Analytmoleküle kann der Rest einfach abgewaschen werden. Auch die Substanzen aus eingetrockneten Tröpfchen können gewaschen werden. Das ist besonders vorteilhaft, da so auch störende Puffersubstanzen und Salze der Lösung entfernt werden können.

Die Oberfläche unter einem Tröpfchen mit etwa 10 Nanoliter Lösung hat etwa 250 Mikrometer Durchmesser und kann dabei größenordnungsmäßig 10 Femtomol an Analytmolekülen aufnehmen, die eine monomolekulare Adsorptionsschicht bilden. Ist die Konzentration wesentlich geringer als ein Picomol pro Mikroliter, so kann die Lösung nach jeweiligem Trocknen des Tröpfchens — eventuell unter Einschluss mehrerer Waschvorgänge — mehrfach aufpipettiert werden. Die Fläche des Tröpfchens kann während der Spektrenaufnahme durch mehrere Laserschüsse abgetastet werden und ergibt nach Addition der Meßwerte sehr gute Spektren der Analytsubstanz. Meist können von einem einzigen Fleck sogar mehrere Spektren gewonnen werden. Diese Spektren haben wegen der Gleichmäßigkeit der Auftragung alle die gleiche Qualität.

Für hochverdünnte Analytlösungen, bei denen ein aufgetragener Tropfen nicht genügend Moleküle für eine massenspektrometrische Untersuchung enthält, hat sich eine andere Art der Probenträger bewährt. Die adsorptive Matrixschicht nach dieser Erfindung wird auf die Oberfläche von winzigen magnetischen Kügelchen ("magnetic beads") aufgebracht, die in Durchmessern von einem bis 100 Mikrometern erhältlich sind. Besonders vorteilhaft ist es hier, die Matrixschicht durch Vernetzung vollkommen unlöslich zu machen. Die Kügelchen werden dann in kleiner Anzahl der sehr verdünnten Analytlösung beigegeben. Durch langandauernden und bewegten Kontakt können so die Analytmoleküle praktisch quantitativ adsorptiv an die Oberfläche der Kügelchen gebunden werden. Wenn dabei keine restlose Adsorption erfolgen soll, wird die restliche Analytlösung nicht durch freierwerdende Substanzen der Matrix verunreinigt. Die Kügelchen lassen sich anschließend durch magnetische Spezialwerkzeuge aus der Lösung herausholen und auf eine flache Probenträgerunterlage bringen. Dort können sie durch magnetische Kräfte, durch übergelegte Feinstgitter oder aber einfach durch Ankleben befestigt werden. Sie werden, nach Überführung ins Vakuum, direkt vom Laser beschossen und liefern ein hervorragendes MALDI. Auch die Kügelchen lassen sich so vorpräparieren, daß sie versandt und lagerfähig werden.

Die Kügelchen sind besonders effektiv einsetzbar, wenn nur geringste Mengen an Analytsubstanz vorliegen, weil sie die Analytmoleküle praktisch vollständig auch aus sehr verdünnten Lösungen oder aus kleinsten Volumina adsorbieren können. Dabei braucht die Lösung nicht pipettiert oder sonstwie transportiert werden, und es werden daher die Verluste durch Wandad-

sorptionen so gering wie möglich gehalten. Es lassen sich in dieser Weise sogar Analytsubstanzen aus einzelnen biologischen Zellen einer massenspektrometrischen Analyse zuführen. Die bisher verwendeten MALDI-Verfahren verlangten notwendigerweise eine Bestrahlung des Probenträgers von der Probenseite her, da jeweils nur eine sehr geringe Matrixmenge an der Oberfläche verdampft wurde, also jeweils nur ein Bruchteil der Schichtdicke abgetragen wurde. Auch die Verwendung von magnetischen Kügelchen verlangt einen Beschuß von der Probenseite her, da die Kügelchen undurchsichtig sind.

Werden jedoch flache Probenträger benutzt, so kann ein anderes Verfahren verwendet werden, da die Verwendung einer dünnen Sprengstofflackschicht zu einer vollständigen Verdampfung eines kleinen Schichtbereiches führt, so daß eine nackte Stelle des Probenträgers übrigbleibt. Es ist daher möglich, die Matrixschicht von der Rückseite eines für die Laserstrahlung durchsichtigen Probenträgers her zu bestrahlen und so zu verdampfen. Es ist also ein weiterer Gedanke der Erfindung, durchsichtige Probenträger zu verwenden, die jedoch zur Aufrechterhaltung stabiler elektrischer Potentiale oberflächlich leitend gemacht werden. Die Rückseite des Probenträgers ist für den Laserstrahl in der Ionenquelle viel leichter zugänglich als die Vorderseite, auf der die Beschleunigungs- und Fokussierungsblenden mit ihren hohen Spannungen einem senkrechten Aufschuß oder einem Aufschuß mit kurzer Brennweite im Wege stehen und sehr trickreiche Konstruktionen notwendig machen.

Auf die Wellenlänge des Lasers, die bei bisherigen MALDI-Verfahren immer sehr wichtig war und die Auswahl der Matrixsubstanzen mit bestimmt hat, kommt es nur noch in zweiter Linie an, da es der einzige Zweck der Laserstrahlung ist, den Sprengstoff zu zünden und ein Plasma genügend hoher Temperatur zu erzeugen.

Fig. 1 zeigt eine Anordnung eines flachen, metallischen Probenträgers 1 mit einer Lackschicht 2 aus Zellulosenitrat mit eingelagerten Molekülen einer Substanz wie beispielsweise 10% Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, die beim MALDI-Vorgang zur Ionisierung der auf die Schicht aufgetragenen Analytmoleküle dient. Der Probenträger hat die für Mikrotiterplatten eingeführte Größe von 8×12 Zentimetern und ist mit Schwalbenschwanzführungen 3 versehen, mit denen die Platte auf einem Führungsschlitten befestigt werden kann. Der Probenträger ist auf seiner Schichtseite poliert, um das eingestrahlte Laserlicht zu reflektieren und so eine gute Absorption des Lichts zu ermöglichen.

Eine günstige Ausführungsform ist die in Fig. 1 gezeigte flache, metallische Trägerplatte in der für Mikrotiterplatten standardisierten Größe von 8×12 Zentimetern. Diese Größe paßt in alle gängigen Mikropipettieranlagen und stellt somit eine günstige Voraussetzung für die automatische Probenaufbringung dar. Die Schwalbenschwanzführungen lassen sich zur Befestigung auf beweglichen Probentischen verwenden, auch im Vakuum des Massenspektrometers wird die Platte über diese Führungen einfach gehalten. Für die Verwendung im Vakuum haben sich Führungen bewährt, deren Oberfläche mit Tetrafluorethen ("Teflon") überzogen wurde.

Diese Platte wird nun auf ihrer Probenseite erfindungsgemäß mit der Matrixschicht überzogen. Dabei wird von einem Lack ausgegangen, der aus in Azeton aufgelöstem Zellulosenitrat mit einem Nitrierungsgrad

von etwa 12% und einer Kettenlänge ("Viskosität") von etwa 100 bis 200 Glukosegruppen und einem geringen Anteil an Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure besteht, die ebenfalls im Azeton gelöst ist. Die Schicht muß sehr dünn sein, sie beträgt nur wenige Mikrometer. Zum Auftragen haben sich besonders zwei Verfahren bewährt: das bekannte elektrische Sprühverfahren und das Aufbringen eines Tröpfchens auf die sich schnell drehende Trägerplatte. Das Aufbringen erfolgt erst in einer Umgebung mit gesättigtem Azetondampf, worauf plötzlich angewärmte reine Luft aufgeblasen wird. Die Trocknung erfolgt dann in wenigen Sekunden und erzeugt eine sehr gleichmäßige Schicht. Zellulosenitrat ohne Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure oder andere ionisierende Substanzen hat keine ionisierende Wirkung während des MALDI-Prozesses.

Die etwa 10-prozentige Zugabe von Alpha-Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure hat bisher alle von uns untersuchten als Analytmoleküle verwendeten Peptide und Proteine ionisieren können. Es ist jedoch zu erwarten, daß für andere Analytsubstanzen andere Ionisierer bessere Ergebnisse liefern. Man kann dann leicht verschiedenartige Probenträgersorten verwenden. Es ist aber auch möglich, verschiedene Ionisierer in dem gleichen Matrixgemisch zu verwenden. Sollten sich die verschiedenen Ionisierer nicht in der gleichen Lösung vertragen, so kann man einen schichtweisen Aufbau wählen mit Schichten, die verschiedene Ionisierer enthalten. Für den Benutzer ist es vorteilhaft, wenn eine einzige Trägerplattensorte für alle analytischen Aufgaben benutzt werden kann.

Diese Trägerplatten sind auch für die schnelle Analyse sehr großer Zahlen an Proben geeignet (sogenannte "massiv-parallele Verarbeitung"). Es lassen sich bei einem Millimeter Abstand auf eine Trägerplatte 9600 Probenflecken aufbringen und analysieren. Bei einem halben Millimeter Abstand lassen sich 38 400 Proben aufbringen. Rechnet man 2 Sekunden Analysezeit pro Probenfleck, so kann man diese 38 400 Proben in etwa 6 Stunden analysieren. Diese Zielsetzung liegt für medizinische Reihenuntersuchungen vor. Automaten für die schnelle Belegung von Trägern mit solchen Probenanzahlen sind zur Zeit in Entwicklung.

Diese Trägerplatten verlangen eine Konzentration des Analyten von etwa einem Picomol pro Mikroliter. Umgerechnet in Gewichtskonzentrationen entspricht das in etwa einem Gewichtsanteil von einem Millionstel des Lösemittels (1 ppmw). Das ist eine geringe Konzentration, niedriger als sie normalerweise bei chromatographischen oder elektrophoretischen Trennvorgängen anfällt.

Sollte die verwendete Konzentration aber noch viel geringer sein, so kann man eine ganz andere Art der Probenträger verwenden, die aus magnetisierbaren Kügelchen von etwa 10 Mikrometern Durchmesser bestehen. Diese werden ebenfalls mit einem lackartigen Überzug der Matrix überzogen, und können wie die Trägerplatten über längere Zeiten gelagert werden. Eine geringe Anzahl der Kügelchen wird dann der sehr verdünnten Lösung für längere Zeit und unter starker Bewegung beigegeben. Die adsorptive Oberfläche der Kügelchen nimmt dann die Analytsubstanzen aus der Lösung auf und hält sie fest. Die Kügelchen können dann mit magnetisierbaren Spezialwerkzeugen aus der Lösung entnommen, gewaschen, und auf eine flache Unterlage aufgebracht werden. Sie werden dort befestigt und dem MALDI-Prozeß zugeführt. Die Kügelchen lassen sich sehr leicht mit einer dünnen Matrixschicht überzie-

hen, indem man sie einzeln durch einen sehr feinen (elektrisch erzeugten) Lacksprühstrahl fallen läßt. Nach dem Verlassen des Lacksprühstrahls sind die Kügelchen nach Durchmessen einer Strecke von etwa 20 Zentimetern trocken und können daher einfach in einem Glas aufgefangen werden. Die Einrichtung einer heißen Wirbelschicht im Glas verhindert das Zusammenbacken der noch frischen Kügelchen. — Auch ein pneumatisches Versprühen der Kügelchen zusammen mit einer sehr verdünnten Lacklösung führt zu einer dünnen Lack-schicht auf den Kügelchen.

Es ist nun eine häufig auftretende weitergehende analytische Aufgabe, aus einem Lösungsgemisch, in dem sich nicht nur die interessierende Analytsubstanzen befindet, die Analytsubstanzen gezielt herauszuholen. Man möchte beispielsweise aus einem Proteingemisch ein interessierendes Protein herausholen und auf Mißbildungen untersuchen. Diese Aufgabe kann, wie bekannt, durch Antikörper geleistet werden. Diese Antikörper lassen sich nun relativ leicht auf die lackartige Matrixschicht aufbringen und dort kovalent binden, ohne die Binde-Eigenschaften der Antikörper zu zerstören. Solcherart vorgefertigte Probenträger sind dann ganz speziell auf die Analyse bestimmter Proteine eingerichtet. Besonders die als Kügelchen ausgebildeten Probenträger können so verwendet werden. In dieser Weise wird es beispielsweise möglich, aus einer einzigen Zelle ein ganz bestimmtes Eiweiß herauszuholen und zu untersuchen.

Aber auch die gezielte Veränderung der Analytmoleküle läßt sich so erreichen. So ist es beispielsweise für die Identifizierung von Eiweißen günstig, das Eiweiß einer enzymatischen Verdauung zuzuführen, die die Kette der Aminosäuren zwischen oder nach jeweils genau definierten Aminosäurepaaren auftrennt. So trennt beispielsweise das Enzym Trypsin nach dem Aminosäurepaar Lysin und Arginin. Die Molekulargewichte der Teilstücke aus dem tryptischen Verdau lassen sich sehr schnell über eine Protein-Datenbank eine Identifizierung zu. Dieser Verdau kann nun in situ auf dem Probenträger vorgenommen werden. Dazu ist es erforderlich, Trypsin (oder ein anderes Enzym) auf dem Probenträger adsorbiert oder sonstwie fest gebunden zu haben. Da die Enzyme relativ stabil sind, lassen sie sich auf den Probenträgern lange lagern. Sie müssen jedoch von den in der Regel sauren Ionisierern ferngehalten werden, was aber durch den lackförmigen Aufbau der Schicht gewährleistet ist. Für diese Art der Vorpräparierung mit veränderlichen Biochemikalien sind sowohl flache Trägerplatten wie auch magnetisierbare Kügelchen geeignet.

Patentansprüche

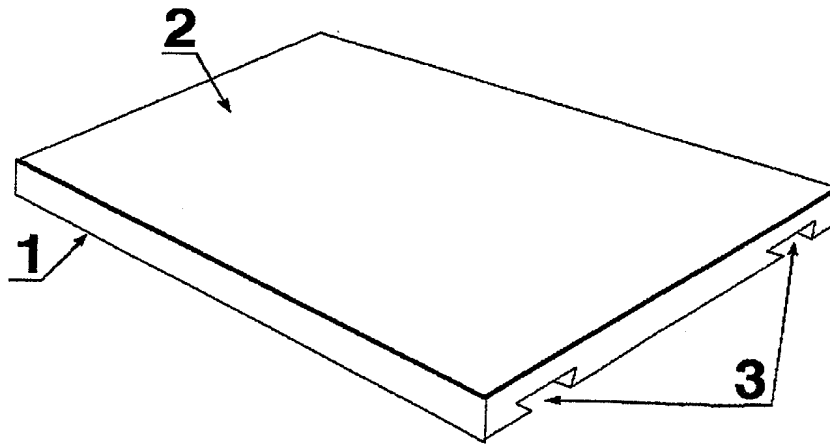
1. Probenträger für das MALDI-Verfahren mit einer vorpräparierten Oberflächenschicht, die aus einer Matrixsubstanz mit mindestens zwei Komponenten besteht, dadurch gekennzeichnet, daß diejenigen Matrixkomponenten, die zur Ionisierung der Analytmoleküle während des Desorptionsprozesses dienen, von einer weiteren Matrixkomponente dicht umschlossen und vor Veränderungen während der Lagerung geschützt werden.
2. Probenträger nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die schützende Matrixkomponente eine Lackschicht bildet.
3. Probenträger nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die lackförmige Schutzkomponente

- während des Desorptionsvorganges durch die Laserstrahlung in kleinere Moleküle zersetzt wird.
4. Probenträger nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Laserstrahlung zersetz- 5
bare, lackförmige Schutzkomponente ein Sprengstoff oder eine sprengstoffähnliche Substanz mit Fähigkeit zur Verpuffung ist.
5. Probenträger nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Zellulosenitrat als zersetzbare, lack- 10
förmige Schutzkomponente verwendet wird.
6. Probenträger nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Zellulosenitrat mit einem optimalen 15
Nitrierungsgrad zwischen 11,5 und 13% Stickstoff verwendet wird.
7. Probenträger nach einem der vorhergehenden 20
Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Lackschicht nach Aufbringen auf den Probenträger zumindest oberflächlich vernetzt und dadurch unlöslich gemacht wird.
8. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekenn- 25
zeichnet, daß die Vernetzung durch Bestrahlung erzeugt wird.
9. Probenträger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Brückenbildner für die Vernet- 30
zung verwendet wird.
10. Probenträger nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Diisocyanat als Brückenbildner 35
verwendet wird.
11. Probenträger nach einem der vorhergehenden 40
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nur eine Substanz als Matrixkomponente für die Ionisierung der Analytsubstanz vorhanden ist.
12. Probenträger nach einem der vorhergehenden 45
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere verschiedenartige Substanzen als Matrixkomponenten für die Ionisierung der Analytsubstanz vorhanden sind.
13. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixkomponenten in ge- 50
meinsamer Lösung als Lackschicht aufgebracht werden.
14. Probenträger nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Matrixkom- 55
ponenten in verschiedenen Lackschichten übereinander eingebettet sind.
15. Probenträger nach einem der vorhergehenden 60
Ansprüche 2 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Lackschicht durch eine Deckschicht abgedeckt wird, die keine Matrixkomponente für die Ionisierung der Analytsubstanz enthält.
16. Probenträger nach einem der vorhergehenden 65
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine weitere Komponente die Matrix färbt und für das verwendete Laserlicht absorptiv macht.
17. Probenträger nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixschicht durch eine weitere Komponente elektrisch leitfähig gemacht wird.
18. Probenträger nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß feinstdispersierter Kohlenstoff 60
als elektrisch leitfähige Komponente verwendet wird.
19. Probenträger nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß er aus kleinen magnetischen Kügelchen (magnetic beads) 65
besteht.
20. Probenträger nach einem der vorhergehenden
Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Ober-

fläche der Matrixschicht mit Reagenzien belegt ist, die die aufzubringenden Analytmoleküle chemisch verändern.

21. Probenträger nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Reagenzien an die Oberfläche kovalent gebunden sind.
22. Probenträger nach einem der vorhergehenden Ansprüche 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß Enzyme als Reagenzien verwendet werden, die aufgebraute Proteine in charakteristischer Weise zerschneiden.
23. Probenträger nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche mit 5
Agenzien belegt ist, die ganz spezifisch bestimmte Arten von Analytmolekülen festhalten können.
24. Probenträger nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper als Agenzien verwendet werden.
25. Verfahren zur Herstellung von plattenförmigen Probenträgern nach einem der Ansprüche 2 bis 18, 10
dadurch gekennzeichnet, daß der in Lösung befindliche Lack durch Sprühen, Drucken oder Streichen auf die Probenträgerplatte aufgebracht wird.
26. Verfahren zur Herstellung von plattenförmigen Probenträgern nach einem der Ansprüche 2 bis 18, 15
dadurch gekennzeichnet, daß der in Lösung befindliche Lack durch Auftropfen auf eine sich schnell drehende Trägerplatte aufgebracht wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



Figur 1